

Aus dem Institut für Angewandte Physiologie der
Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. Franz Josef Haberich

BESTIMMUNG DER ULTRAFILTRIERBARKEIT DES
ANTIDIURETISCHEN HORMONES; NACH EINER
IN VIVO METHODE AN DER WACHEN RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von —

GERD THIELMANN
—
aus Haiger

Marburg 1976
—

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Angewandte Physiologie der
Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. Franz Josef Haberich

BESTIMMUNG DER ULTRAFILTRIERBARKEIT DES
ANTIDIURETISCHEN HORMONES; NACH EINER
IN VIVO METHODE AN DER WACHEN RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERD THIELMANN

aus Haiger

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 5.11.1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof.Dr. F. Neurath
Referent: Prof.Dr. O. Aziz
Correferent: Prof.Dr. H. Bernhardt

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. METHODE	3
1. Operation	3
2. Versuchsablauf	5
3. Auswertung	9
III. KRITIK DER METHODE	11
1. Ausscheidungsdyamik	11
2. Harnkonzentration	11
3. ADH - Empfindlichkeit	12
4. Ultrafiltrat - Beurteilung	13
IV. ERGEBNISSE	14
1. endogene Versuchsreihe	16
2. exogene Versuchsreihe	17
3. Rechenbeispiel	18
V. DISKUSSION	19
VI. ZUSAMMENFASSUNG	23
VII. TABELLEN	24
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	31



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552327_0032

I. EINLEITUNG

Um eine gültige Aussage über die Beschaffenheit des ADH-Moleküls und dessen Bindung an Plasma- oder Serumeiweiß zu machen, sind in den vergangenen Jahren viele unterschiedliche Methoden entwickelt worden.

Schon N.A. THORN und L. SILVER (1957) versetzten Ratten-serum mit exogenem ADH, welches in sehr hoher, physiologisch kaum vorkommender Konzentration vorlag. Bei der Elektrophorese fanden sie es mit β -Globulinen vereinigt. Eine Ultrafiltration des Serums erfolgte mit einer Colloidum-Membran in vitro. Ultrafiltrat und Serum wurden sodann auf ihr ADH-Gehalt hin untersucht.

M. GINSBURG und H. HELLER (1953) und GINSBURG und M. IRELAND (1963) sprechen von der möglichen Existenz eines Trägerproteins (Neurophysin), woran ADH gebunden sein könnte. Eine Ultrafiltration wird nicht beschrieben.

BEUZEVILLE und H.D. LAUSON (nicht veröffentlichte Arbeit) versuchten eine Ultrafiltration mittels einer Cellophan-Membran unter starkem Filterdruck und über einen längeren Zeitraum. Der über diese Zeitspanne mögliche Aktivitätsverlust blieb unberücksichtigt.

Die Versuche wurden unter ungleichen Bedingungen, meist in vitro, und mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Auch die benutzten Hilfsmittel unterschieden sich in vielen Punkten (Übersichtsarbeit von H.D. LAUSON, 1974).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals eine in vivo Methode angewendet, wobei das Ultrafiltrat und das Kontroll-

blut unmittelbar aus dem strömenden Blut einer wachen Ratte gewonnen und mit möglichst geringem Zeitverlust einer Testratte injiziert wird. Auf diese Weise wird sowohl exogenes, der Ratte per infusionem zugeführtes, als auch endogenes, von der Ratte selbst produziertes ADH, untersucht.

II. METHODE

Zu den exogenen und endogenen Versuchen wurden weibliche Albinoratten vom Stamm Wistar verwendet, die ein Operationsgewicht von 190 bis 270 Gramm aufwiesen. Die für die Versuche vorgesehenen, wie auch die operierten Tiere, wurden in einem temperierten Laborraum gehalten, wo sie dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt waren. Von insgesamt 12 Tieren lieferten 6 quantitativ verwertbare Versuche (10), 3 lieferten bedingt quantitativ verwertbare Versuche (5) und 3 qualitativ zu beurteilende Ergebnisse (4) = 19 Versuche an 12 Ratten.

Als Nahrung bekamen alle Ratten Altromin^R (standardisiertes Trockenfutter für Ratten) und Wasser ad libitum. Nach 2 Tagen zeigte sich bei den operierten Tieren eine deutliche Gewichtszunahme und der Gesundheitszustand war derart wiederhergestellt, daß mit den Versuchen begonnen werden konnte.

1. Operation

Für die Versuchsreihe mußte die Aorta, die V. cava, die V. porta und der Magen mit Dauerkatheter versehen werden. Hierzu dienten Katheter aus Polyvinylchlorid bei einer Stärke von 1,0 x 0,5 mm (Größe P₂; Fa. Braun, Melsungen), die an einem Ende eine speziell bearbeitete Kanülenspitze (Länge 7 mm) entsprechend der Injektionsnadel Record Nr. 12 besaßen. Nach der Methode von AZIZ und Mitarbeiter (1964) werden in einer Athernarkose nach medianer Laparotomie die

Katheter plziert und mit Hilfe eines Troikars beiderseits der Wirbelsäule auf dem Rücken des Tieres herausgeführt. Die Gefäßkatheter werden mit einer verdünnten Heparin-Lösung (1 Teil Liquemin und 9 Teile 0,9% ige NaCl-Lösung = 500 E/ml) gefüllt und mit aufgepaßten PVC - Stopfen abgedichtet.

Die auf einige Millimeter dargestellte Aorta wird mit einem Seidenfaden umschlungen und ein Luftknoten gelegt, worauf der in das Gefäß eingestochene Dauerkatheter (PVC P₂, Kanüldurchmesser 0,5 mm) angeknötet wird. Das Gefäß darf durch die Befestigungsschlinge nicht stenosiert werden; der Gefäßkatheter muß so plziert werden, daß er nicht herausrutschen oder abknicken kann.

Die Gefäßkatheter der V. cava und der V. porta (Vinyl, Kanüldurchmesser 0,7 mm) werden ebenso nach beschriebener Methode einoperiert und mit Doppelschlingen befestigt.

Der Duodenalkatheter (PVC P₂, Fa. Braun, Melsungen - mit zugespitztem Katheterende) wird im Pylorusteil des Magens eingestochen und 2 cm in die pars descendens des Duodenum vorgeschoben. Hinter einer am distalen Ende des Katheters befindlichen PVC - Manschette (P₃ - Fa. Braun, Melsungen) wird eine Befestigungsschlinge aus Seide gelegt und mit einer Serosanahrt wird der Katheter an der Magenwand fixiert.

Anschließend vernäht man mit Catgut die Muskelschichten und mit Seide die übrigen Schichten. Zum komplikationslosen Verheilen der Wunde wurde die Naht mit einigen Tropfen eines Breitbandantibiotikums beträufelt und mit einem Heftpflasterstreifen versorgt.

Die auf dem Rücken befindlichen Katheterenden werden mit einem Acetonkleber (UHU-Alleskleber) und Mull an der Austrittsstelle fixiert und mit einem circulären Heftpflasterverband gehalten (Technik siehe AZIZ u. Mitarb, 1964).

Bis zum Versuchsbeginn werden die operierten Tiere in Einzelkäfigen gehalten und täglich kontrolliert.

2. Versuchsablauf

Am Versuchstag wurde den Tieren ca. eine Stunde vor Versuchsbeginn in einem kurzen Ätherrausch ein Blasenkatheter (PVC, P₂) gelegt.

Das proximale Ende des Katheters wird mit einem Heftpflasterstreifen an der Schwanzwurzel gehalten. Für die Zeit des Versuchs sitzt das Tier in einer durchsichtigen, der Körperform angepaßten, Kunststoffröhre, die mit einem verschließbaren Deckel und einem Kotfang ausgestattet ist.

Mit verdünnter Heparin-Lösung prüft man die Gefäßkatheter durch Aspirationsprobe auf ihre Durchgängigkeit.

Das katheterisierte Tier erholt sich sehr schnell aus der Äthernarkose und nach ca. 1 Stunde kann über den Duodenalkatheter mit der Hydrierung begonnen werden. Bis zum Erreichen einer stabilen Diurese hydriert man mit 6 ml oder 9 ml Leitungswasser pro Stunde (Pumpe: Fa. Braun, Melsungen). Zur Registrierung der Diurese wurde der Blasenkatheter an einen photoelektrischen Tropfenzähler angeschlossen. Die

fallenden Urintropfen lösen Impulse der Phototransistoren in der Lichtschranke aus, die, elektronisch verstärkt und in Spannungssprüngen umgewandelt von einem Kompensations-schreiber pro gewählte Zeiteinheit registriert werden. Die durch den Durchmesser des Tropfrohrs bedingte Tropfen-größe betrug unter den herrschenden Versuchsbedingungen durchschnittlich 17,2 μ l und wurde zuvor bestimmt.

Ist eine gleichmäßige Diurese erreicht, kann mit dem Versuch begonnen werden. (siehe Abb. 1)

Eine regelbare, mit kleinen Rollen versehene Rollenpumpe pumpt Blut aus dem implantierten Aortenkatheter über eine Ultrafiltrationskapsel (AZIZ und DENNHARDT, 1973) zurück in den Katheter der V. porta.

Die Filtrationskapsel ist zweiteilig und besteht aus einer unteren und einer oberen Kammer, die durch eine Membran mit einer Porengröße von 15 nm (Durchmesser 25 nm) voneinander getrennt sind (Fa. Sartorius GmbH, Göttingen; Typ: SM 11733).*

Die untere Kammer besitzt eine zufließende und eine abfließende Öffnung (Durchmesser 1,0 x 0,5 mm) und weist ein Füllvolumen von 0,5 ml auf.

Die obere Kammer, in der sich das Ultrafiltrat sammelt, besteht aus konzentrisch angeordneten, untereinander kommunizierenden, 100 μ tiefen Einkerbungen. Dieses Konstruktionsprinzip dient der Stabilisierung der Filtrationsmembran und reduziert den Totraum auf ein Minimum.

* Struktur: Maschengewebe, Zelluloseacetat, Schichtdicke 100 μ m, zur Ultrafiltration.

Die beiden Kapselhälften werden mit eingelegter Membran und Dichtungsring miteinander von 4 Schrauben abgedichtet und beide Kammern blasenfrei mit 0,9 % iger Kochsalzlösung gefüllt.

Das einströmende Blut gelangt durch den Pumpdruck über den afferenten PVC - Schlauch in die untere Kammer und baut hier verstärkt durch den Widerstand des efferenten PVC-Schlauches den Filtrationsdruck von ca. 125 mm Hg. auf. Bei einem Blutdurchfluß von ca. 1,5 ml/Minute beträgt der Ultrafiltrationsfluß ca. 5 μ l/min.

Über eine Öffnung in der Mitte der oberen Kammer gelangt das Filtrat in ein dicht verschlossenes Auffanggefäß. Es durchläuft dabei eine von Wasser umspülte, temperierte Kammer, die von einem Erhitzer mit Thermostat auf konstant 40° gehalten wird. Zwei kleine, als Platinröhrchen ausgebildete Elektroden, die die Leitfähigkeit des Filtrats messen, sind zwischen Kammer und Auffanggefäß geschaltet und über ein Eichgerät mit dem Kompensationsschreiber verbunden.

Die für die exogene Versuchsreihe hydrierten Tiere erhalten über den Gefäßkatheter der V. cava eine Dauerinfusion (Pumpe: Fa. Braun, Melsungen) mit 0,9 % iger NaCl-verdünnte ADH - Lösung (Rinder-Arginin-Vasopressin, 6,3 IE/ml, Präparat der Fa. Hoechst), so daß eine Verdünnung von 10 μ E/ μ l vorlag und bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 20 μ l/min 200 μ E/min appliziert wurden.

Nach Erreichen einer maximalen Antidiurese wird das über die Filtrationskapsel gewonnene Ultrafiltrat (Totraum beachten!)

in einem abgedichteten Gefäß aufgefangen und für weitere Versuchszwecke kühl gelagert.

Für die endogene Versuchsreihe dursten die Tiere zwischen 45 und 67 Stunden. Auch bei diesen Versuchen wird fortlaufend das Ultrafiltrat aufgefangen.

Während der Ultrafiltratgewinnung entnimmt man ca. 1,8 ml Blut/30 Minuten aus dem Gefäßkatheter der v. porta. Nach Ansaugen tropften ca. 2 bis 4 Tropfen Blut / Minute in ein Sammelgefäß. Anschließend zentrifugiert man das Blut mit 32.000 Umdrehungen/min. und erhält einen Serumüberstand von ca. 1,0 bis 1,2 ml, der abpipettiert und für weitere Versuchszwecke kühl gelagert wird.

Ein Empfängertier wird bis zum Erreichen einer stabilen Diurese mit 5 % igem Alkohol in den Duodenalkatheter sensibilisiert. Sowohl die erhaltenen Ultrafiltrate als auch die Seren, deren antidiuretische Aktivitäten getestet und miteinander verglichen werden sollten, wurden dem Tier in die V. cava verabreicht. Das Empfängertier für den Test war zum Teil das gleiche Tier, aus dem das Ultrafiltrat bzw. Serum gewonnen wurde. Jedoch mußte bis zum Erreichen einer hohen Diurese eine geraume Zeit abgewartet werden, da sich das Tier nur sehr langsam aus der vorherigen Antidiurese normalisierte. Deshalb wurde einem bereits parallel zum Hauptversuch laufenden Testversuch der Vorzug gegeben. Das Empfängertier war ein nach beschriebener Methode operiertes Tier, jedoch nur mit V. cava- und Duodenalkatheter. Entsprechend den applizierten Mengen Ultrafiltrats und Serums, die zwischen 0,25 ml und 0,52 ml lagen, zeigte das Empfängertier antidiuretische Aktivitäten.

Zur Bestimmung der erzielten Aktivitäten wurde am Ende eines jeden Versuches ein ADH - Standard (Rinder - Arginin - Vasopressin, 6,3 IE/ml, Präparat der Fa. Hoechst) in die V. cava injiziert. Die Auszählung der Standard - Antidiurese und der Vergleich mit den vorausgegangenen Tests war die Grundlage zur Ermittlung der unbekannten Aktivitäten. Der Standard war in allen Versuchen der gleiche und betrug 30 bzw. 25 μ E. Er wurde vor jedem Versuch möglichst steril angesetzt und kühl gelagert.

In einigen Versuchen wurde die Elektrolyt - Leitfähigkeit auf dem Kompensationsschreiber aufgezeichnet, um eventuelle Auswirkungen während der Antidiurese festzustellen.

Stichprobenhaft wurden mit einem Biuret - Reagenz Eiweißbestimmungen des Ultrafiltrats und des Serums durchgeführt (siehe Tab. 3).

3. Auswertung

Bei der Auswertung wird die Phase der durch Hydrierung erreichten Ausgangsdiurese der durch die ADH - Gabe erzielten Antidiurese gegenübergestellt. Das Tropfendefizit der Antidiurese wird unter der Annahme ermittelt, daß die Diurese, die sich eingestellt hatte, unvermindert weiter gegangen wäre und daß die in der antidiuretischen Phase eingesparte Flüssigkeitsmenge proportional der applizierten ADH - Dosis ist (ADH - Wasseräquivalent, GAUER und TATA, 1966).

Die antidiuretische Aktivität der Proben wurde auf die Weise standardisiert, daß anschließend eine bekannte ADH-Dosis injiziert wurde, die ein Tropfendefizit der gleichen Größenordnung erzeugte.

III. KRITIK DER METHODE

1. Ausscheidungsdynamik

Als Kontrolle der ADH - Sekretion (endogen) und der ADH - Infusion (exogen) bei dem Versuchstier dienten die Veränderungen der Urinausscheidung bei dem Empfängertier.

Nach einer kontinuierlichen Alkoholhydrierung (Vasopressinsekretionshemmung) zeigten 10 bis 20% der Tiere bereits 15 Minuten nach Aufnahme der hypotonen Flüssigkeit ein Ansteigen der Diurese bis zum Erreichen eines stabilen Maximums nach ca. 1 Stunde.

Die am Anfang periodisch auftretenden Ausscheidungsschwankungen (KÜSTERMANN und HABERICH, 1966) und Verzögerungen sind bedingt durch die Zeit, die für Wasserresorption, Hemmung der Vasopressin-Sekretionsmechanismen und Abbau des zirkulierenden Vasopressins benötigt wird.

In einigen Versuchen zeigte sich jedoch eine große Unsicherheit in der Ausscheidungsdynamik und Störungen in Form von sehr ausgeprägter Nierenfunktionsrhythmik. Diese Tiere wurden aus dem Versuch genommen.

2. Harnkonzentration

Die erzeugte Diurese durch übermäßige Flüssigkeitszufuhr führt zu einem maximalen Harnfluß (10 - 14 Tropfen/Minute = 175 - 240 μ l). Nach Gabe von ADH tritt eine vermehrte Rück-

resorption in den Tubuli auf und der Harn konzentriert sich. Die im Harn gelösten Teilchen beeinflussen die Oberflächenspannung und somit die Urintropfengröße in den verschiedenen Versuchsphasen der Diurese und Antidiurese.

Da die Konzentrationsschwankungen bei den relativ geringen ADH - Mengen, die in den Versuchen vorkamen, nicht stark waren, kann dieser Fehler toleriert und auf eine eventuelle Volumenkorrektur verzichtet werden.

3. ADH - Empfindlichkeit

Nach Beurteilung aller durchgeführten Versuche zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der Testtiere auf die applizierten ADH - Gaben. 60% der Tiere reagierten bei Applikation des ADH - Standards (30 μ E) mit sehr ähnlichen Volumendefiziten, 18% lagen deutlich darunter und 12% überstiegen diesen Wert. Es zeigte sich ferner, daß gutausscheidende Tiere empfindlicher auf ADH - Gaben reagierten als weniger gut ausscheidende.

Die Genauigkeit der ADH - Aktivitätsbestimmung wird naturgemäß um so größer sein, je größer die Empfindlichkeit der Tiere ist. Bei den empfindlicheren Tieren dürfte der Fehler (ungeachtet der übrigen Fehlerquellen) bei etwa $\pm 2\%$ liegen, bei den unempfindlichen bei etwa $\pm 13\%$.

Die hier zugrundeliegende Annahme geht davon aus, daß ein Defizit von 2 Tropfen als sicherer antidiuretischer Effekt angesehen werden kann.

4. Ultrafiltrat - Beurteilung

Unter Verwendung der Membran SM 11733 (Fa. Sartorius GmbH, Göttingen) in der Ultrafiltrationskapsel wurde ein Ultrafiltrat gewonnen, welches durch Biuret-Bestimmung keine Extinktion ergab. Albumin und Globulin waren nicht vorhanden und es bleibt die Frage, ob kleinere Eiweißmoleküle existieren.

Da das Blut an der Filteroberfläche vorbeiströmt, spielt die Ausrichtung der Blutbestandteile gegenüber der Membran eine Rolle, so daß Fadenmoleküle geringen Molekulargewichtes eine Porengröße von 15 nm nicht passieren können und im Ultrafiltrat nicht nachzuweisen waren. Ein solches Verhalten wird z.B. beim Ultrafilter der Nierenglomerula angegeben.

Die festgesetzten Durchlassgrenzen stellen keinen absoluten Wert dar. Vielmehr muß bei Membranfiltern angenommen werden, daß auch sehr viel kleinere Moleküle vom Filter zurückgehalten werden. Moleküle vom Gewicht 80.000 z.B. werden nach Angaben der Hersteller bei einem statischen Filtrationsverfahren noch zu 50% zurückgehalten. Albumine, deren Molekulargewicht bei 69.000 liegt, würden nach diesen Angaben also zu einem großen Teil den Filter passieren. Gerade diese jedoch bilden Fadenmoleküle, was erklärt, weshalb die Biuret-Probe im Ultrafiltrat negativ blieb. Es muß hier betont werden, daß die Probe bei den verwendeten Filtern stets (auch in einer anderen im Institut durchgeführten Versuchsreihe) negativ verlief. Somit bleibt die Durchlassgrenze der hier verwendeten Filter unklar.

Eine Passage von ADH - Molekülen mit einem Molekulargewicht von 1064 war dagegen zu 100% gesichert.

IV. ERGEBNISSE

Wie beschrieben wurden am Versuchstag den Testtieren in einem Ätherrausch (2 - 4 Minuten) Blasenkatheeter gelegt und nach ca. 1 Stunde wurden sie mit 9 ml/Stunde 5 % igem Alkohol intraduodenal hydriert. Die auf dem Ordinatenschreiber registrierte Diurese entsprach meistens dem zugeführten Flüssigkeitsvolumen (17,2 μ l/Tropfen, bei 8 - 10 Tropfen/Minute = 0,14-0,17 ml/min.) Von einem Diurese-Minimum langsam ansteigend, erreichten die Tiere nach einer Zeit von 40 - 60 Minuten ein konstantes Maximum. Hier wurde den Testtieren abwechselnd ein bestimmtes Volumen (0,25 ml bis 0,52 ml) Ultrafiltrat und Serum i.v. verabreicht. Die Zeit, die bis zum Sichtbarwerden der Antidiurese verstreicht, die Latenzzeit, schwankt zwischen 1 bis 4 Minuten. Bedingt durch die ADH - Konzentration der verabreichten Dosismengen, zeigt die antidiuretische Antwort ein mehr oder weniger steiles Abfallen von dem vorherigen konstanten Plateau bis zu einem Minimum und aus diesem ein stetiges Ansteigen bis zu der Ausgangshöhe der Kontrollldiurese. Die dazwischenliegende Zeit, die Eliminationszeit (Zeitpunkt null = Eingabe) betrug je nach ADH - Gehalt der Probe 3 bis 20 Minuten. Sowohl die untere als auch die obere Grenze der Nachweisempfindlichkeit bei dem Empfängertier hing von der Geschwindigkeit der Dosiseingabe ab. Bei der Durchführung der Tests wurde darauf geachtet, daß vergleichende Tests immer mit der gleichen Injektionsgeschwindigkeit vorgenommen wurden (1 - 3 sec.).

Nach langen Vorversuchen wurden die ADH - Infusionsraten beim Empfängertier langsam gesteigert, bis in den meisten

Versuchen gut sichtbare und daher quantitativ auswertbare antidiuretische Aktivitäten bei den Tests am Spendertier auftraten.

Das applizierte Volumen Ultrafiltrat bzw. Serum sollte höchstens 0,50 ml betragen.

Diese Injektionsmengen wurden sowohl in die V. cava als auch in die V. porta appliziert, ohne einen merklichen Unterschied in der antidiuretischen Antwort vorzufinden.

Abb. 2 zeigt einen für alle Versuche typischen Verlauf der Diuresekurve des Testtieres; eine konstante Tropfenfolge in der Kontrolldiurese, die durch die Injektion der Testsubstanz unterbrochen wird. Bereits an diesem Beispiel läßt sich ablesen, daß das Tropfendefizit bei Gabe gleicher Volumina etwa gleiche Werte für das Ultrafiltrat und Serum zeigt.

Ergebnisse der endogenen Versuchsreihe

Wie man der Tabelle 1 entnimmt, dursteten die Tiere zwischen 42 und 67 Stunden. Die Ultrafiltratmengen, die während der Versuche aufgefangen wurden, betrugen im Durchschnitt $4,4 \mu\text{l/min}$. Auffallend war, daß in den Versuchen, in denen die aufgefangene Ultrafiltratmenge sehr gering ausfiel ($0,52 \text{ ml}/242 \text{ min} = 2,1 \mu\text{l/min}$), die antidiuretische Aktivität der Probe ($0,52 \text{ ml}$) bei dem Testtier ebenfalls gering war (Aktivitäten: Ultrafiltrat/Serum = $14,4 / 12,5 \mu\text{E/ml}$).

Das Gegenteil zeigt der in der Tabelle zuerst aufgeführte Versuch, wobei die aufgefangene Ultrafiltratmenge ($7,1 \mu\text{l/min}$) höher lag und die applizierte Dosis ($0,25 \text{ ml}$) auch sehr hohe Aktivitäten ergab (Aktivitäten: Ultrafiltrat/Serum = $94,2 / 96,4 \mu\text{E/ml}$).

In Abb. 3 sind alle Werte der endogenen Versuchsreihe (5 Versuche an 3 Tieren) graphisch dargestellt. Es sind jeweils die antidiuretischen Aktivitäten (in $\mu\text{E/ml}$) für Ultrafiltrat (Ordinatenachse) und Serum (Abszissenachse) in dem Diagramm aufgetragen. Die durch den Nullpunkt des Koordinatenkreuzes verlaufende Gerade ($\tan \alpha = 1$) bezeichnet die Identitätslinie. Man sieht, daß die eingetragenen Punkte um diese Gerade gestreut liegen, so daß keine signifikante Differenz zwischen den Aktivitäten festzustellen ist ($p \gg 0,05$ für $\tan \alpha$ verschieden von 1).

Ergebnisse der exogenen Versuchsreihe

Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse von 5 Versuchen an 3 Tieren der exogenen Reihe. In allen Versuchen wurde den Versuchstieren konstant $200 \mu\text{E}/\text{min}$. ADH zugeführt (durchschnittliche Infusionsdauer 113 min pro Versuch).

Die ermittelten Aktivitäten der Proben zeigen große Unterschiede. Sie sind darauf zurückzuführen, daß das Testtier unterschiedlich empfindlich reagiert, wie auch die Tests mit den ADH - Standards zeigen ($30 \mu\text{E}$ ergaben einen Defizit von beispielsweise $233 \mu\text{l}$, während $25 \mu\text{E}$ einen Defizit von $518 \mu\text{l}$ erzeugten). In einer Reihe von Versuchen (5, tabellarisch nicht erfaßt) waren die Testergebnisse keiner eindeutigen Quantifizierung zugänglich, wobei jedoch stets die ungefähren Aktivitäten von Serum- und Ultrafiltratproben gleich waren. Bei anderen Versuchen, bei denen die ADH - Dosis offenbar zu gering war, zeigte weder das Serum noch das Ultrafiltrat eine Aktivität.

In Abb. 4 sind die Ergebnisse des exogenen Kollektives dargestellt. Das Diagramm zeigt die antidiuretischen Aktivitäten (in $\mu\text{E}/\text{ml}$) für Ultrafiltrat (Ordinatenachse) und Serum (Abszissenachse). Die durch den Nullpunkt des Koordinatenkreuzes verlaufende Gerade ($\tan \alpha = 1$) bezeichnet die Identitätslinie. Die eingetragenen Punkte liegen um die Gerade gestreut und man sieht keine signifikante Differenz zwischen den Aktivitäten ($p \gg 0,05$ für $\tan \alpha$ verschieden von 1).

Rechenbeispiel

Zur rechnerischen Ermittlung der Ergebnisse, die hier am Beispiel eines exogenen Versuches vom 14.8. aufgezeigt werden, benötigt man die Werte der durch das Ultrafiltrat erzeugten Tropfendefizite (11,6 Tropfen/13') und die durch das Serum erzeugten Tropfendefizite (12 Tropfen/14'). Diese durch Auszählen ermittelten Tropfendefizite ergeben bei bekannter Tropfengröße (17,2 μ l) für das Ultrafiltrat-Volumendefizit den Wert 199,5 μ l und für das Serum-Volumendefizit 206,4 μ l. Bezogen auf 1 ml ergeben sich bei gleichen Applikationsmengen von 0,5 ml für das Ultrafiltrat 399,0 μ l/ml und für das Serum 412,8 μ l/ml. Der am Ende eines jeden Versuches in gleicher und bekannter Höhe gegebene ADH - Standard (30 μ E) ergab bei diesem Versuch ein Tropfendefizit von 14,5 Tropfen/9' und ein Volumendefizit (14,5 Tr. x 17,2 μ l) von 249,4 μ l.

Daraus ergeben sich folgende Aktivitäten:

für das Ultrafiltrat:

$$\frac{30 \mu\text{E} \times 399,0 \mu\text{l/ml}}{249,4 \mu\text{l}} = 47,99 \mu\text{E/ml}$$

für das Serum:

$$\frac{30 \mu\text{E} \times 412,8 \mu\text{l/ml}}{249,4 \mu\text{l}} = 49,65 \mu\text{E/ml}$$

V. DISKUSSION

ADH, ein Hormon des Hypophysenhinterlappens, ist ein Octapeptid von bekannter Struktur, einem Molekulargewicht von 1084 (Argininvasopressin) und konnte synthetisch dargestellt werden.

Man postulierte für das Hormon eine Proteinbindung im Blutplasma (VAN DYKE et al. 1942, 1957), doch spricht heute die verfügbare chemische Evidenz gegen eine solche Forderung (ACHER und FROMAGEOT, 1957, GINSBURG und IRELAND, 1964).

Demnach ist, trotz zahlreicher Untersuchungen mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen, die Frage der Ultrafiltrierbarkeit von Vasopressin nicht endgültig entschieden (LAUSON, 1974).

In vivo weisen Daten über die Elimination von ADH (Clearance und Halbwertszeit) auf den Verteilungsraum und somit indirekt auf den Zustand des Hormons im Blut hin. In Versuchen an alkoholnarkotisierten Ratten haben CZACZKES und Mitarbeiter (1964) einen sehr geringen Verteilungsraum bestimmt, während AZIZ (1969) an wachen Ratten nachwies, daß ADH sich im gesamten Extrazellularraum verteilt. Umgekehrt können in vitro Versuche über die Ultrafiltrierbarkeit von ADH Aufschluß über den Verteilungsraum geben. Auch hier stehen völlig gegensätzliche Ergebnisse an der Ratte einander gegenüber.

THORN und SILVER (1957) fanden ADH - Aktivität stets an Molekülen gebunden, die größer als 70.000 waren. Das Ultrafiltrat war frei von Aktivität.

CZACZKES und KLEEMAN (1964) fanden gleiche Aktivität im Serum und im Ultrafiltrat von Rattenblut. Bemerkenswert ist, daß die in vivo Versuche von CZACZKES und Mitarbeiter einerseits und die in vitro Versuche von THORN und SILVER andererseits nicht ohne Kritik geblieben sind (LAUSON, 1974). Untersuchungen an anderen Spezies sind ähnlich widerspruchsvoll (Zusammenfassung bei LAUSON, 1974).

Für den Hund, die Katze und den Menschen wird, außer von CZACZKES u.a. (1964) nicht bestritten, daß ADH den Intra-vasalraum verläßt (LAUSON und BOCANEGRA 1961, BROOK und SHARE 1966, SHARE 1961, TATA u.a. 1965, SCHRÖDER und ROTT 1959).

CZACZKES spricht zwar dem ADH keinerlei Bindung an das Plasmaeiweiß zu, doch verhindere eine Capillarschranke den Übertritt in den Extravasalraum.

Nach GINSBURG u. SMITH (1959) und AROSKAR u.a. (1964) passiert Oxytocin, ebenfalls ein Oktapeptid, ungehindert diese Capillarschranke.

Die vorliegende Arbeit verwendet eine weitgehend in vivo Methode, die besonders bei der Ultrafiltration Manipulationen vermeidet, die eventuell zu einem Wirkungsverlust von ADH führen könnte.

Beide Versuchsreihen mit exogenem und mit endogenem ADH zeigen, daß in ihrer Dosis variabel abgestufte ADH - Infusionen bzw. -Sekretionen bei gesunden bzw. durstenden Ratten im Ultrafiltrat und Serum etwa gleiche ADH - Konzentrationen bedingen, wie Tests an alkoholnarkotisierten Ratten ergaben.

Durch die Äthanolhydrierung wird die periphere ADH - Empfindlichkeit stark vergrößert (DICKER 1953, HELLER 1960, VAN DYKE and AMES 1951, GAUER und TATA 1966) und noch ein Nachweis von 1 bis 2 μE ADH ermöglicht. Ferner unterdrückt die Hyperhydrierung die endogene ADH - Sekretion des Testtieres (EGGLETON 1942, TATA und BUZALKOV 1966) und es kommen nur die zugeführten ADH - Mengen zur Wirkung.

Dennoch zeigten die Testtiere trotz gleicher Bedingungen unterschiedliche Reaktionen, die nicht anders zu deuten sind als Folge unterschiedlicher individueller Empfindlichkeit gegenüber ADH.

Bei den endogenen Versuchen zeigten die Tiere nach Wasserverlust (hier Dursten) ebenfalls sehr unterschiedliche Plasmaspiegel.

Man kann davon ausgehen, daß unter normalen Laboratoriumsbedingungen (Temperatur, Gesundheitszustand, Ruhe, regelmäßige Nahrung) sich ein bestimmter ADH - Level einstellt, der bei nicht narkotisierten und normal hydrierten Ratten zwischen 1,5 bis 4 $\mu\text{E}/\text{ml}$ (TATA und BUZALKOV, 1966; 1 - 1,5 $\mu\text{E}/\text{ml}$, AZIZ) liegt (bei alkoholnarkotisierten Tieren ist das Plasma frei von ADH).

Bei etwa gleicher Durstdauer (67 und 62 Stunden s.Tab.) zeigten zwei Tiere von fast gleichem Gewicht (241 g und 222 g) einen Plasmaspiegel von 60 - 90 bzw. 12,5 $\mu\text{l}/\text{ml}$, woraus man auf eine ähnlich unterschiedliche ADH - Sekretion schließen kann.

Es wäre zu diskutieren, ob nicht auch dies Folge der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Niere für ADH bei individuellen Tieren ist.

Schon bei Abweichungen der oben genannten Normbedingungen (z.B. durch Schmerz, zu hoher Blutverlust bei Op., etc.) verschieben sich die Ergebnisse.

Zu berücksichtigen ist ferner eine periodische, stoßweise ADH - Ausschüttung (AZIZ, 1969) mit Sekretionsintervallen, die zwischen 5 bis 6 Minuten liegen (s. auch KÜSTERMANN und HABERICH, 1966; WOIDT und HABERICH, 1967).

Dieses Verhalten wird nur bei dem hier verwendeten in vivo Verfahren zum Problem. Dem wurde insofern Rechnung getragen, als sowohl die Blutentnahmen für die Plasmagewinnung als auch die Ultrafiltratgewinnung sich kontinuierlich über mehrere Sekretionsperioden erstreckte und synchron vorgenommen wurden.

Für ein in vitro Verfahren heißt das, daß Ultrafiltrat und Plasma aus dem gleichen Blut-Pool stammen müssen.

In Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen aus der Literatur kommt diese Arbeit zu dem Schluß, daß das Antidiuretische Hormon in der Blutbahn keinerlei Bindung an größeren Eiweißmolekülen eingeht.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. 190 - 260 g schwere Ratten werden mit chronischen Kathetern in der V. cava, V. portae, der Aorta und dem Duodenum versehen. Es wird eine Methode beschrieben mit der am wachen Tier fortlaufend Ultrafiltrat gewonnen werden kann.
2. 100 - 200 μ l exogenes Arginin-Vasopressin werden pro min. in die V. cava infundiert. Serum und Ultrafiltrat werden simultan aus dem Blut der V. portae gewonnen.
0,2 - 0,52 ml Serum und Ultrafiltrat werden in die V. cava von Testratten gespritzt, die sich in einer starken Alkoholdiurese befinden.
Die entstehende antidiuretische Reaktion wird als Maß für die ADH - Aktivität der Injektate verwendet.
3. Durstende Tiere (endogenes ADH !) werden der gleichen Prozedur unterzogen und deren Serum und Ultrafiltrat ebenfalls auf ADH - Aktivität getestet.
4. Serum und Ultrafiltrat sowohl bei den Versuchen mit exogenem als auch mit endogenem ADH weisen etwa gleiche antidiuretische Aktivität auf. Das Antidiuretische Hormon liegt also stets in einer ultrafiltrierbaren Form vor.

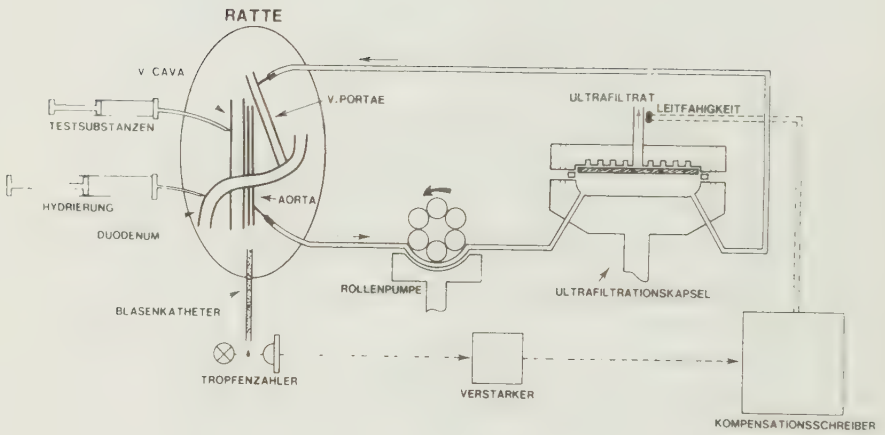


Abb.: 1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues

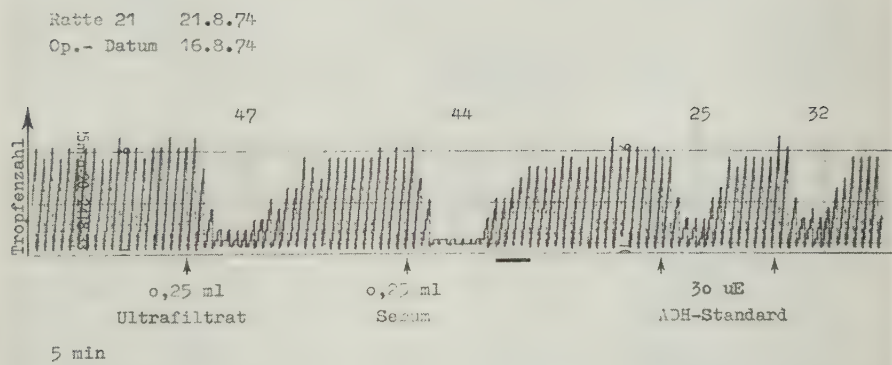


Abb. 2 Originaldiuresekurve der endogenen Versuchsreihe. Jede Stufe gleich 1 Tropfen Urin; Rückstellung jeweils nach 1 Minute. Zahlen über der Kurve gleich Tropfendefizite. Man sieht, daß Serum und Ultrafiltrat etwa die gleiche antidiuretische Aktivität enthalten.

Datum	Versuchsgewicht (in g)	Durst- dauer (Std)	applizierte Menge Ultrafiltrat (ml)	applizierte Menge Serum (ml)	A D H Standard (pE)	U P Y N V C L U M E N D E P I Z I T				A K T I V I T Ä T E N			
						A D H (pE)	Ultrafiltrat (ml)	Serum (ml)	Urinvolumendefizit (pro ml) Ultrafiltrat (ml)	Serum (pE/ml) Ultrafiltrat	Serum (ml)	Ultrafiltrat	Serum
26.8.	241	67	0,25	0,25	30	963,2	756,8	774,0	3027,2	3096,0		94,28	96,43
22.8.	259	42	0,25	0,25	30	584,8	120,4	137,6	481,6	550,4		24,705	28,235
22.8.	259	42	0,40	0,40	30	652,6	275,2	275,2	688,0	688,0		31,58	31,58
26.8.	241	67	0,45	0,45	30	963,2	911,6	877,2	2025,7	1949,3		63,09	60,71
19.8.	222	62	0,52	0,52	30	1002,0	250,5	217,1	481,7	417,5		14,423	12,50

Tabelle 1: Ergebnisse der endogenen Versuchsreihe

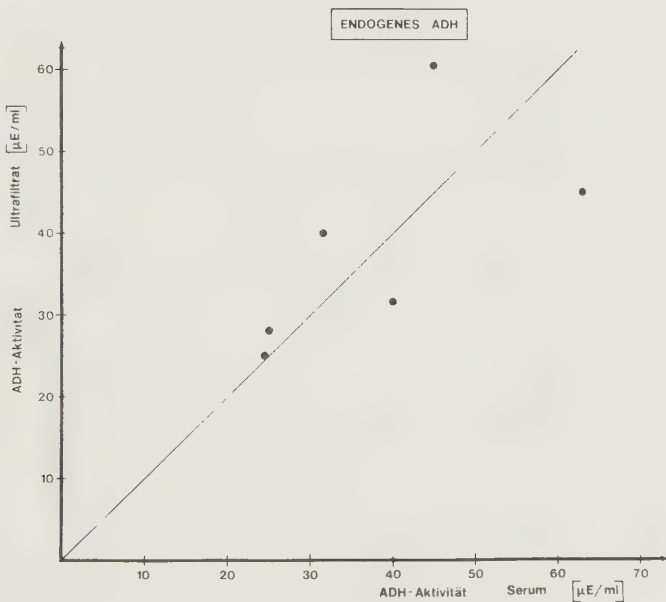


Abb. 3 Vergleich der ADH - Aktivität des Ultrafiltrats mit der des Serums.

Gerade gleich Identitätslinie. Versuche mit endogenem ADH.

Datum	Versuchsgewicht (in g)	A D H Infusion (ml/min)	applizierte Menge Ultrafiltrat (ml)	applizierte Menge Serum (ml)	A D H Standard (μ g)	URIN VOLUME N D E P I Z I T		Urinvolumen defizit (pro ml)		A K T I V I T Ä T E N (μ g/ml)	
						A D H (μ l)	Ultrafiltrat (μ l)	Serum (ml)	Ultrafiltrat (μ l)	Serum (μ l)	Ultrafiltrat Serum
26. 9.	221	200	0,25	0,25	30	233,8	63,46	50,10	253,84	200,4	32,57 25,71
7. 10.	200	200	0,25	0,25	25	517,7	50,10	83,50	200,40	334,0	9,677 16,129
7. 10.	200	200	0,50	0,50	25	517,7	551,10	551,10	1102,20	1102,2	53,225 53,225
7. 10.	200	200	0,50	0,50	25	517,7	551,10	551,10	1102,20	1102,20	53,225 53,225
14. 8.	260	200	0,50	0,50	30	249,4	199,50	206,40	399,00	412,8	47,99 49,655

Tabelle 2: Ergebnisse der exogenen Versuchsreihe

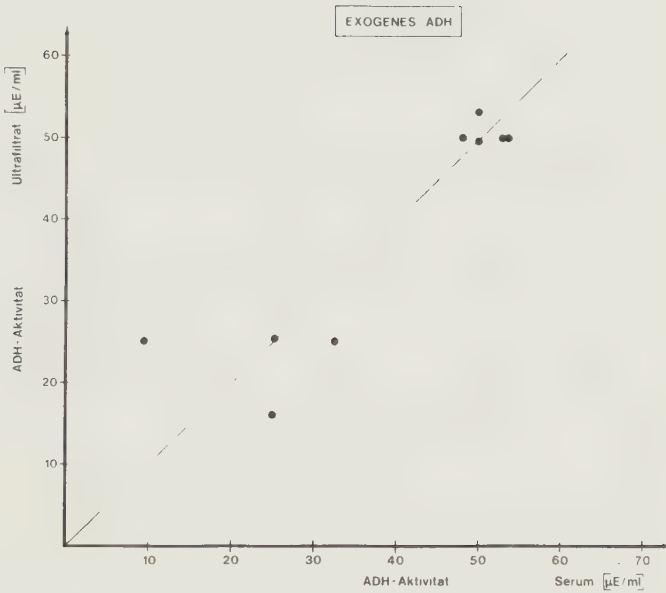


Abb. 4 Vergleich der ADH - Aktivität des Ultrafiltrats mit der des Serums.
Gerade gleich Identitätslinie. Versuche mit exogenem ADH.

Tab. 3: Eiweißbestimmungen mit Biuret

Extinktionen bei einer Schichtlänge von 1 cm und der Wellenlänge 546 nm.

	16.7.	15.8.	8.10.	10.10.
Standard (6 g%)	0,266	0,315	0,278	0,299
Serum	0,275	0,209	0,233	0,315
Ultrafiltrat	./.	./.	./.	./.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ACHER und FROMAGOET In: HELLER, H. (Hrsg.)
The Neurohypophysis,
London (1957), S. 39.8
2. AROSKAR, J.P. Renal excretion and tissue dis-
tribution of radioactive oxytocin
in rats
CHAM, W.Y.
STOUFFER, J.E. Endocrinology, 74: 226 (1964)
SCHNEIDER, C.H.
MURTI, V.V.S. and
DU VIGNEAUD, V.
3. AZIZ, O. Versuche am gekreuzten Kreislauf mit
wachen Ratten
II.Endogene Sekretion und Plasmakonzentration von ADH
Pflügers Arch. 311, 355-372 (1969)
III.Clearance und Verteilungsraum von
exogenem und endogenen ADH
Pflügers Arch. 311, 373-388 (1969)
4. AZIZ, O. and Ultrafiltration of Circulating Blood
DENNHARDT, R. in vivo
A Method for Continuous Measurements
of Serum Concentrations
Pflügers Arch. 341, 347-350 (1973)
5. AZIZ, O. Technik der Dauerkatheterisierung der
HABERICH, F.J. und V.portae und der V. cava caudalis an
NOWACKI, P.E. der wachen Ratte
Naturwissensch. 51; 557 (1964)

6. BEUZEVILLE, C.A. and LAUSON, H.D. The question of vasopressin removal by the liver in rats
Fed.Proc., 23: 150, (1964)
7. BISSET, G.W. and LEE, J. Oxytocic and antidiuretic activity in blood from the conscious subject
Lancet, 2: 770 (1957)
8. BROOK, A.H. and SHARE, L. On the question of protein binding and the diffusibility of circulating antidiuretic hormone in the dog
Endocrinology 78, 779-785 (1966)
9. CZACZKES, J.W. and KLEEMANN, C.R. The effect of various states of hydration and the plasma concentration on the turnover of antidiuretic hormone in animals
J.Clin.Invest. 43, 1649-1658 (1964)
10. CZACZKES, J.W. Physiologic studies of antidiuretic hormone by its direct measurement in human plasma
KLEEMANN, C.R. and KOENIG, M.
J.Clin.Invest. 43, 1625 (1964)
11. DICKER, S.E. A method for the assay of very small amounts of antidiuretic activity with a note on the antidiuretic titre of rats blood.
J.Physiol. 122: 149 (1953)

12. VAN DYKE, H.B. and
AMES, R.G. Alcohol diuresis
Acta endocrin. 7, 110-121 (1951)
13. VAN DYKE et al.,
in HELLER, H. (Hrsg),
The Neurohypophysis,
London (1957), S. 65.7
14. VAN DYKE et al. J.Pharmacol exp. Ther., 74 (1942)
15. EGGLETON, G. The diuretic action of alcohol in
man
J.Physiol. (London) 101, 172 (1942)
16. GAUER, O.H. Vasopressin studies in the rat
I. A sensitive bioassay for exogenous
vasopressin
Pflügers Arch.ges.Physiol. 290,
279 (1966)
17. GAUER, O.H. and
TATA, P.S. Vasopressin studies
II. The amount of water reabsorbed
by the rat kidney after a single i.v.
injection of vasopressin: the vaso-
pressin-water-equivalent
Pflügers Arch.ges.Physiol. 290,
286 (1966)
18. GINSBURG, M.and
HELLER, H. The antidiuretic assay of vasopressin
by intravenous injection into un-
anaesthetised rats
J. Endocrin. 9: 267-273 (1953)

19. GINSBURG, M. and IRELAND, M. The hormone-bridging protein of the neurohypophysis
J. Physiol. 169: 15P, (1963)
20. GINSBURG, M. and IRELAND, M. Binding of vasopressin and oxytocin to protein in extracts of bovine and rabbit neurohypophyses
J. Endocrin. 30: 131-145 (1964)
21. HELLER, J. The physiology of antidiuretic hormone IV. The effect of certain anaesthetics on the antidiuretic activity of the rat blood plasma
Physiol. Bohemoslowenica 9; 283 (1960)
22. KÜSTERMANN, G. und HABERICH, F.J. Gibt es eine Rhythmik der Urinsekretion mit kurzer Periodendauer?
Pflügers Arch. ges. Physiol. 289, R 90 (1966)
23. LAUSON, H.D. Zusammenfassung LAUSON 1974
Metabolism of the neurohypophysial hormones
Chapter 14: 287-393
Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology (1974)
24. LAUSON, H.D. Metabolism of antidiuretic hormone
Amer. J. Med. 42, 713 (1967)

25. LAUSON, H.D. and BOCANEGRA, M. Ultrafilterability of endogenous antidiuretic hormone from plasma of dogs
Amer.J. Physiol. 200, 486-492 (1961)
26. LAUSON, H.D. and BOCANEGRA, M. Clearance of exogenous vasopressin from plasma of dogs
Amer.J. Physiol. 200, 493 (1961)
27. SCHRÖDER, R. und ROTT, D. Über die Bestimmung und das Verhalten von ADH im menschlichen Plasma
Klin.Wschr. 37, 1175 (1959)
28. SHARE, L. Acute reduction in extracellular fluid volume and concentration of antidiuretic hormone in blood
Endocrinology, 69: 925, (1961)
29. TATA, P.S. and BUZALKOV, R. Vasopressin studies in the rat
III Inability of ethanol anaesthesia to prevent ADH secretion due to pain and hemorrhage
Pflügers Arch.ges.Physiol. 290, 293 (1966)
30. TATA, P.S. HELLER, H. und GAUER, O.H. Über die antidiuretische Aktivität in der Lymphe von Katzen
Pflügers Arch.ges.Physiol. 283, 222 (1965)
31. THORN, N.A. Binding in vitro of highly-purified arginine-vasopressin and synthtic oxytocin to rat serum globulin
Acta endocrinol., 30:472 (1959)

32. THORN, N.A. and
SILVER, L. Chemical form of circulating antidiu-
retic hormone in rats
J.Exper.Med. 105: 575 (1957)
33. WOIDT, B.J. und
HABERICH, F.J. Über die Rhythmik der Urin-Ruheseekretion
bei wachen Ratten und ihre Beziehung
zu Kreislaufgrößen
Pflügers Arch.ges.Physiol. 297,
R 74 (1967)

Herrn Prof.Dr. F.J. Haberich gilt mein Dank für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an dem Physiologischen Institut der Universität Marburg.

Herrn Prof.Dr. O. Aziz bin ich zu großem Dank für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit verpflichtet.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei Frau U. Herchen und Herrn E. Sommer für die Unterstützung bei den Laborarbeiten bedanken.

Herrn T. Mazola danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Abbildungen.

Lebenslauf

Am 21. Juli 1947 wurde ich in Haiger als zweiter Sohn (von insgesamt zweien) des Kaufmanns Karl-Heinz Thielmann und seiner Ehefrau Erna, geb. Balz, geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule und von 1958 bis 1961 die Realschule in Haiger. Anschließend ging ich auf das Wilhelm von Oranien Gymnasium in Dillenburg und legte am 25. Juni 1968 die Reifeprüfung ab.

Vom 1. Juli 1969 bis 31. Dezember 1970 absolvierte ich meine 18-monatige Bundeswehrzeit in einem Sanitätsbereich in Neustadt/Kreis Marburg .

Am 15. April 1971 begann ich mein zahnmedizinisches Studium an der Philipps-Universität in Marburg, an der ich am 7. April 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 10. September 1973 die Zahnärztliche Vorprüfung und am 11. August 1976 die Zahnärztliche Prüfung ablegte.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

Ahrens, Amon, Aurich, Aziz, Baltzer, Braasch, Bernhardt,
Bode, Castenholz, Dennhardt, Dimroth, Dombrowski, Fruhstorfer,
Gallwitz, Golenhofen, Haberich, Hamelmann, Havelmann, Hennis,
Hensel, Hering, Heuser, Janke, Karlson, Kleine, Koch, Koecke,
Koransky, Lauer, Lorenz, Ludwig, Lüttke, Maroske, Niemeyer,
Petry, Pfütz, Remschmidt, Richter, Rohen, Rupec, Schachtschabel,
Schienbein, Schiff, Schmidt, Schmidt, Schmitz-Moormann,
Schneider, Schnell, Seifart, Sekeris, Spröggel, Thoenes,
Walcher, Wehrmeyer, Wendt, Wesemann, Wiegandt, Zickendraht.

